"Vergleichende Untersuchungsmethoden zur Harnstoff-Bestimmung"
Eine Studie zur Feststellung der Verwertbarkeit labormässiger Untersuchungen.

Carlfried Schmid
aus Regensburg

1960 No 116

Aus der Universitätsklinik für Haut-und Geschlechtskrankheiten
Erlangen
Direktor: Prof. Dr. med. C.M. H a s s e l m a n n

"Vergleichende Untersuchungsmethoden zur Harnstoff-Bestimmung" Eine Studie zur Feststellung der Verwertbarkeit labormässiger Untersuchungen.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander Universität
zu
Erlangen-Nürnberg

Vorgelegt von
Carlfried Schmid
aus Regensburg

Gedruckt mit Genehmigung der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. A. Windorfer
Referent: Prof.Dr. C.M. Hasselmann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.9.1962

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Disposition

I. Einleitung

II. Bestimmungsmethoden

a) Rest-Stickstoff nach Kjeldahl

b) Makro-Methode für Harnstoff

c) Mikro-Methode für Harnstoff

III. Experimentelle Ergebnisse

a) + b) + c)

IV. Schlußfolgerung

V. Zusammenfassung

VI. Literaturverzeichnis

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536528_0065

I. Einleitung

Betrachtet man das ständig mehr und mehr aufeinander Abgespieltsein zwischen dem Arzt mit seinem klar umrissenen klinischen Krankheitsbild und andrerseits dem Labor mit einer exakt durchgeführten biochemischen Analyse zur Klärung bzw. Festigung der gestellten Diagnose, so rücken beide, in ihren jeweils arbeitsmäßig gestellten Aufgaben, immer näher.

Was hingegen vor etwa 50 Jahren ausschließlich durch das Können und die langjährige Erfahrung eines Arztes seine Diagnose sicherte, so trat in den letzten Jahrzehnten eine wesentliche Unterstützung zur Klärung des klinischen Krankheitsbildes hinzu, bedingt durch die relativ großen Fortschritte auf dem Gebiet der Biochemie und der Laboratoriumstechnik.

Daraus läßt sich die Auffassung vertreten, daß die Medizin von heute hinsichtlich Diagnose und Therapie ein wesentlich engeres Zusammenarbeiten erfordert, gleichsam ein Ineinandergreifen der Arbeitsmethodik des Arztes und der des Laboratoriums.

Demgegenüber taucht aber die Frage auf, daß die Diskrepanz einer im Labor durchgeführten Untersuchung des öfteren übersehen oder beinahe leichtfertig übergangen wird. Diese Abweichung kann entstehen, wenn der Laborbefund dem klinischen Krankheitsbild oder dementsprechend der bereits gestellten Diagnose nicht entsprechen will, oder wenn zwei verschiedene Untersuchungen, ausgeführt durch Personen des Labors, sich zu widersprechen scheinen.

Die causalen Zusammenhänge solcher Fehlresultate können verschiedener Art sein:

1) Das Untersuchungsmaterial ist vielleicht nicht richtig entnommen worden (z.B. Blut mit Oxalat- anstatt Heparinzusatz) oder Nichtberücksichtigung der Raumtemperatur im Laboratorium, da das Untersuchungsmaterial offen stehen gelassen wurde, anstatt in den Eisschrank zu geben.

2) Nichtabsetzung gewisser vorher verabreichter Medikamente, die in Richtung des Untersuchungsergebnisses störend wirken und dadurch ein falsches Bild ergeben.
All das fassen wir zusammen unter dem Begriff Genauigkeit, die zweifelsohne eine präzise Überlegung und Arbeitsweise eines jeden Einzelnen an der Sicherstellung des Befundes erfordern.

3) Auch eine Verwechslung des zu untersuchenden Materials, sei es hinsichtlich des Patienten, oder ein richtig erzieltes Ergebnis mit etwaiger falscher Eintragung, das letzten Endes zu Irrtümern führt, ist durchaus denkbar.

4) Die Interpretation des Resultates ist falsch. Es muß immer wieder daran gedacht werden, daß jedes Ergebnis mit einem bestimmten, leider gelegentlich unbekannten Fehler behaftet ist. Aus diesem Grunde sollten, wenn nicht genügend Erfahrungen über die zu erwartende Fehlerbreite vorhanden bzw. die durch Methodik und Technik der Laborantin bedingte Streuung nicht hinreichend bekannt ist, zumindest Doppelbestimmungen ausgeführt werden. Nur auf diesem Wege läßt sich einigermaßen abschätzen, ob beispielsweise das Resultat einer als Wiederholung durchgeführten Bestimmung wirklich von der früher erhaltenen abweicht; nur dann läßt sich in Grenzfällen aussagen, ob ein Resultat außerhalb der Norm liegt. Obendrein muß noch betont werden, daß der sogenannte "Normalbereich" eine sehr variable Größe ist, die unter anderem ebenfalls wieder von der jeweils angewandten Methode abhängt.

5) Auch können im Labor Fehler auftauchen, wenn auch in der Gesamtbeurteilung des Ergebnisses als minimal zu bewerten, durch eine unbemerkte Fehlleistung der Apparatur (Undichtwerden, Substanzverlust), oder eine unsaubere Handhabung bzw. eine nicht sorgfältige Pflege und Reinigung der dafür bestimmten Geräte. Ebenso ein oberflächliches, nicht genaues Ablesen an einer Skala führt im Endeffekt doch zu gewissen Differenzen und zu ungenauen Wertergebnissen, die von vornherein bei einer gewissen Sorgfalt auszuschließen wären.

In den Vereinigten Staaten haben BELK und SUNDERMANN (1) sich speziell mit dieser Tatsache beschäftigt. Diese stellten fest, daß in den USA die in den Laboratorien erzielten Resultate nur allzuoft fehlerhaft und deshalb unbrauchbar sind, und daß vor allem die Ergebnisse g l e i c h e r Untersuchungen des g l e i c h e n Materials von Labor zu Labor vielfach wertmäßig große Unterschiede aufwiesen. Dabei zeigte sich, daß ungefähr eine Schwankungsbreite von 50 bis 70 % der Laboratorien, an denen je eine Probe ein und desselben Blutes zur Bestimmung verschiedener Komponenten eingesandt worden waren, ganz unterschiedliche Resultate ablieferten, die außerhalb der jeweils erlaubten Fehlergrenze lagen.
Auch in England bemühten sich um die Klärung dieser Probleme WOOTTON und KING (2) und stießen ebenfalls auf die gleichen Verhältnisse wie die in Amerika. Es zeigte sich unter anderem, daß die Resultate, z.B. bei der Untersuchung auf Harnsäure bei einer bestimmten Blutprobe in einem Bereich von 40 bis 180 %, um den als 100 % gedachten Mittelwert herum verteilt waren. Die Entdeckung dieser doch beunruhigenden, gleichsam so sehr variierenden Ergebnissen der einzelnen Labors hatte zur Folge, daß von verschiedener Seite aus Vorschläge gemacht wurden, um gerade die nicht auf einer Ebene miteinander konkurrierenden Werte zumindest auf einen annähernd gleichen Nenner gebracht werden sollten.

Von diesem Gesichtspunkt aus und den beschriebenen Feststellungen, sei es in den Vereinigten Staaten wie in England, kommen wir zu der Überlegung, wo ist die Ursache zu suchen und welche Lösung scheint die richtige zu sein, um die große Schwankungsbreite der so unterschiedlichen Ergebnisse der jeweiligen Labors einander anzugleichen.

Es wäre in Erwägung zu ziehen, ob aufgrund der verschiedenen Resultate nicht eine Kontrolle der Methode und Überwachung der Technik der ausführenden Laborantinnen durch entsprechend geschulte Fachkräfte - sei es Diplom-Chemiker oder Ärzte -, welche neben ihrer ärztlichen Tätigkeit weitgehende Kennt-

nisse in Pharmakologie, Physiologie und Physiologischer Chemie besitzen, um von vornherein so voneinander abweichende Resultate auszuschließen.
Als weiterer Faktor würde eine bessere Ausbildung des chemisch-technischen Personals in Frage kommen, um im Hinblick auf die Wichtigkeit ihrer Tätigkeit im Rahmen des gesamten Klinikapparates präziser und tatkräftiger mit den ihnen anvertrauten und gestellten Aufgaben das Beste herauszuholen.

Außer diesen beiden zur Abhilfe gewisser arbeitsmäßig mangelnder Sorgfalt vorgeschlagenen Maßnahmen treten im Laufe näherer Betrachtung noch einige Faktoren hinzu, die bei genauer Überlegung doch eine Lösung als nicht gar zu schwierig erscheinen lassen.

Es geht um die Tatsache bzw. um die Erkenntnis, daß eine spezielle Einführung einer Mikromethode gegenüber einer Makromethode als weitaus günstiger im Rahmen der gesamten Arbeitskapazität des Labors sich erweist. Bei der ersteren geht es um das Volumen des zu untersuchenden Stoffes, dabei benötigt man nur kleinste, sozusagen minimale Blutmengen, die die Größenordnung von µ-Litern betragen, gegenüber einer Makromethode.
Diese wiederum setzt eine gewisse Routine in der intravenösen Blutentnahme voraus. Ferner benötigt man für die einzelnen zu bestimmenden Untersuchungen weitaus größere Volumenverhältnisse, die je nach Anforderung zwischen 3 bis 10 und mehr Kubikzentimeter schwanken. Nicht zuletzt sei auch der Zeitfaktor zu berücksichtigen, der immer mehr in unserer schnell-lebigen Zeit eine doch nicht unbedeutende Rolle einnimmt. Hinzu kommt noch, was den Patienten betrifft, eine stärkere Belastung durch die intravenöse Blutentnahme, so daß dieser je nach Konstitution und einer etwa bestehenden vegetativen Labilität sehr leicht kollabiert und gerade deshalb den gesamten Arbeitsgang zwischen Station und Labor weitgehend verzögert.
Auch die Reinigung der Kanülen und Spritzen, die für eine Blutentnahme notwendig sind, benötigen arbeitsmäßig und zeit-

lich gesehen mehr Zeitaufwand. Hingegen bei der Mikromethode werden die aus Kunststoff (Polyäthylen) hergestellten Teströhrchen nach Ausführung der Untersuchung lediglich in den Mülleimer geworfen.

Was die Mikromethode angeht, so erzielt man ebenso wie bei der Makromethode doch sichere und deshalb gut verwertbare Ergebnisse, die im Rahmen der jeweils biologischen Schwankungsbreite liegen. Voraussetzung hierfür ist aber, und das möchten wir vor allem betonen, in erster Linie eine noch bessere und sorgfältigere Präzision an der gesamten Arbeitsmethodik einer Laborantin.

Jede neue Methode oder Modifikation richtet sich nach verschiedenen Gesichtspunkten, um Erfolg versprechend zu sein, und so möchten wir an Hand der nachfolgenden Kriterien diese beleuchten.

1) Die Anforderung an ein Ergebnis, d.h. die Richtigkeit der gefundenen Werte sollen möglichst "den wirklichen" theoretisch festgelegten Werten nahekommen. Im Idealfall würde der Wert 100 % betragen.

2) Die Genauigkeit, sozusagen der Beweis einer exakten Arbeitsweise der Geräte und selbstverständlich die der Laborantin, sollten an Hand der Resultate mit einer zweiten Probe von demselben Patientenmaterial ausgeführt werden. Durch diese Doppelbestimmungen sollten innerhalb eines jeweils bekannten, zum Normalbereich im Verhältnis stehenden Fehlerbereiches - gleiche Resultate - erzielt werden.

3) Die Empfindlichkeit der Methode. Es sollten möglichst kleine Mengen reaktionsmäßig nachweisbar sein, um mit den geringsten Mengen von dem jeweiligen Untersuchungsmaterial auszukommen.

4) Die Methode sollte spezifisch sein, d.h. diejenige zu bestimmende Komponente, die man ausschließlich allein benötigt, sollte nur bei der betreffenden hierfür bestimmten Reaktion, allein teilnehmen können.

5) Die Schnelligkeit des Ergebnisses. Dies scheint in unserer Zeit mit den ständig wachsenden Anforderungen an die Aufgaben des Einzelnen nicht unwesentlich zu sein.

   Aufgrund des allgemeinen, sich heutzutage stark bemerkbar machenden, Personalmangels und der gleichzeitig steigenden Leistungen und Fachkenntnisse, verbunden mit einer Verkürzung der Arbeitszeit, ist man gezwungen, eine Methode auszuarbeiten, die trotz einer weniger zeitraubenden Phase im Endeffekt die gleichen Ergebnisse liefert, wenn nicht bessere, als die sonst üblich gehandhabte Arbeitsmethodik eines Labors.
   Andrerseits wäre auch zu erwähnen, daß die Raschheit des Ergebnisses auch aus klinisch-therapeutischen Ursachen des öfteren der Fall sein muß und im Hinblick dessen sich wieder bestätigt findet, daß die Schnelligkeit des Resultates sowohl für den Arzt als auch für den Patienten von weittragender Wichtigkeit ist.

6) Auch die Kosten über das jeweilige angewandte Verfahren soll nicht unberücksichtigt gelassen werden. Dabei ist der Methode der Vorzug zu geben, die in ihrer gesamten Ausführung letzten Endes billiger zu stehen kommt, als eine gleichwertige Methode, deren Arbeitsgang kostenmäßig wesentlich teurer kommt.

All die aufgezählten Punkte und die Erfüllung dieser würden einen Idealzustand darstellen, der nicht so ohne weiteres als de facto angesehen werden darf. Deshalb ist nach eingehender Prüfung an einer neu anzuwendenden Methode jeweils von Fall zu Fall zu entscheiden, welchem Kriterium die grössere Bedeutung zukommt.

Für jedes einzelne Laboratorium bestehen normale Schwankungsbreiten, je nach Art der angewandten Technik, der betreffenden Methode sowie der Geschicklichkeit und der Handhabung eines Analytikers. Diese sollten sich aber in einer Ebene der biologischen Verwertbarkeit der Resultate bewegen.

Aus diesem Grunde erschien es uns ratsam, die physiologische Schwankungsbreite von verschiedenen in unserem klinisch-chemischen Labor routinemäßig angewandten Methoden festzulegen. Dazu gehört in erster Linie die Bestimmung des Rest-Stickstoffs sowie des Harnstoffs, wobei beim letzteren gleichzeitig der Vergleich zweier Bestimmungsmethoden, nämlich einer Makro- und Mikromethode durchgeführt werden sollten.

II. Bestimmungsmethoden

Bei der Rest-Stickstoffbestimmung wurde der Stickstoffgehalt nach der von KJELDAHL (3) angegebenen Methode im Serum bestimmt. Der Harnstoff wurde einmal als Makromethode volumetrisch nach KOWARSKY (4), das andere Mal als Ultra-Mikromethode - modifiziert von FEARON und FRIEDMANN (5) - kolorimetrisch mit Diacetylmonoxim bestimmt.
Für die Untersuchungen wählten wir männliche Patienten unserer Univ.-Hautklinik im Alter von 20 bis 65 Jahren aus, die lediglich an Hand ihres derzeitigen dermatologischen Krankheitsbildes in stationärer Behandlung standen, bei denen aber weder schwere dermatologische Erkrankungen, z.B. Pemphigus vulgaris, Impetigo contagiosa, Mykosis fungoides noch internistisch-pathologische Befunde, z.B. Herzinsuffizienz, Niereninsuffizienz, Diabetes vorlagen.
Die intravenöse Blutentnahme erfolgte jeweils morgens, nüchtern zur gleichen Zeit gegen 8 Uhr bei dem Patienten und anschließend wurde das Blut sofort verarbeitet.

IIa. Rest-Stickstoff nach Kjeldahl

Unter dem Begriff Rest-Stickstoff versteht man den Nicht-eiweiß-Stickstoff des Blutes, d.h. diejenige Stickstoffmenge, die nach völligem Ausfällen des Eiweißes aus dem Blutserum in dem eiweißfreien Filtrat zurückbleibt. Dieser

stickstoffhaltigen Substanz sind in erster Linie der Harnstoff-N, der Aminosäuren-N und in kleinen Mengen Kreatinin, Kreatin, Harnsäure, Methylguanidin, Purinderivate und auch als anorganische Verbindung der Ammoniak-N enthalten.

Die Bedeutung des Rest-Stickstoffs in physiologisch-chemischer Hinsicht, so stellt dieser gleichsam Schlackensubstanzen dar, oder anders ausgedrückt, es handelt sich um Exkretionsstoffe, also Stoffe, welche aufgrund physiologisch-chemischer Reaktionen im Organismus entstehen und unbedingt aus dem Blut über den Harn ausgeschieden werden müssen. Bei Nichtausscheidung kommt es zu einer Veränderung der Blutzusammensetzung, zu einer Übersättigung im Blut und dadurch zu einer bedrohlichen Störung des gesamten Stoffwechselvorganges.

Im Prinzip handelt es sich bei der Rest-Stickstoff-Bestimmung um die Bestimmung von Stickstoff in einem von Eiweiß befreiten Serumfiltrat. Das chemische Geschehen im Hinblick auf Oxydation und Reduktion bei der Rest-N-Bestimmung nach KJELDAHL (3) gliedert sich in zwei Abschnitte, einmal der Vorgang bei der Veraschung und zweitens der der Destillation.

Das Filtrat wird verascht. Bei der Veraschung werden die nachzuweisenden stickstoffhaltigen Substanzen, die in Lösung vorliegen, mit konz. Schwefelsäure (H_2SO_4) unter der Wirkung eines Katalysators Kaliumsulfat (K_2SO_4) und Kupfersulfat ($CuSO_4$), dieser wiederum zur Erhöhung des Siedepunktes beitragend, verascht. Im Veraschungsprodukt liegt der Stickstoff als Ammoniumsulfat $(NH_4)_2SO_4$ vor. Dann wird bei der Destillation mittels einer konzentrierten Natronlauge der Ammoniak freigesetzt und durch Wasserdampfdestillation in eine vorgelegte Schwefelsäure übergeführt. Durch Rücktitration mit Natronlauge läßt sich dann der Stickstoff-Gehalt berechnen.
Reaktionsmäßig handelt es sich dabei um folgende Gleichung:

$$(NH_4)_2SO_4 + 2\ NaOH \longrightarrow 2\ NH_4OH + Na_2SO_4$$

$$NH_4OH + \text{Wasserdampf} \longrightarrow NH_3 + H_2O$$

$$NH_3 + H_2SO_4 \longrightarrow (NH_4)_2SO_4 + H_2O$$

Da es sich definitionsgemäß bei dem Rest-Stickstoff um stickstoffhaltige Substanzen des von Eiweiß befreitem Serum handelt, erstellt sich die Frage, wie man möglichst quantitativ die Eiweiß-Fraktionen abtrennt, ohne daß es erstens zur Mitfällung von stickstoffhaltigen, nicht zum Eiweiß gehörenden Substanzen kommt, und zweitens, daß das Eiweiß vollkommen quantitativ abgeschieden wird. Dabei ist aber von enormer Wichtigkeit, gleichsam von ausschlaggebender Bedeutung für den richtigen Ablauf der zu erwartenden Reaktion, die Wahl des Eiweiß-Fällungsmittels. Die Trennung der Eiweißkörper soll sich so vollziehen, ohne daß gewisse am Rest-Stickstoff beteiligten Substanzen, eben durch das gewählte Fällungsmittel, mitgerissen werden, um hinterher keine Störungen im Ablauf des sich anschließenden Untersuchungsganges ergeben würden.

Aufgrund dieser Tatsache waren wir bestrebt, verschiedene Möglichkeiten und Überlegungen bei der Verwendung eines Eiweiß-Fällungsmittels heranzuziehen, um das auszuwählen, das im großen und ganzen die beste Voraussetzung ergibt.

Als geeignetes und bestes Fällungsmittel hat sich nach HALLMANN (6) und HOPPE-SEYLER-THIERFELDER (7) die T r i c h l o r e s s i g s ä u r e erwiesen.

In der folgenden Tabelle sind noch andere Eiweiß-Fällungsmittel aufgeführt, aus der man ersehen kann, daß die Stickstoffwerte verschiedene Ergebnisse aufweisen.

Die wichtigsten Eigenschaften von enteiweissten Blutfiltraten.

Enteiweissungsmittel	Normalwerte für Rest-N mg%	Übergang ins Filtrat			Ausbeute an Filtrat	p_H des Filtrates
		Harnsäure	Harnstoff	Kreatinin		
Trichloressigsäure	25-40	+	+	+	79%	1,o
Wolframsäure (Folin-Wu)	25-40	+	+	+	68%	5,1
Uranylazetat	25-40	+	+	+		
Metaphosphorsäure	25-40	+	+	+	81%	2,1
Pikrinsäure	-		+	+	86%	2,2
Zinkhydroxyd (Somogyi)	20-25	0	+	+		
Kadmiumhydroxyd (Fujita-Iwatake)	20-30	0	+	±		

Aus diesem Grunde hat sich die Enteiweißung mit Trichloressigsäure als Standard-Methode durchgesetzt und man sollte daher nach SOPP (8) unter Rest-N diejenige Stickstoffmenge verstehen, die nach Eiweiß-Fällung mit T r i c h l o r e s s i g s ä u r e in das Filtrat übergeht.

Nach der Enteiweißung mit Trichloressigsäure tritt im Arbeitsgang der Rest-Stickstoffbestimmung die der Veraschung hinzu. Bei der Veraschung handelt es sich in erster Linie um die Zerstörung von organischer Substanz.

Als Methoden der Veraschung bietet sich einmal der Weg über die Erhitzung (trockene Veraschung), oder über die nasse Veraschung. Bei der trockenen Veraschung muß man berücksichtigen, daß ein Teil der sich bildenden anorganischen Bestandteile verflüchtigen kann, z.B. die der Halogene. Dies läßt sich zwar durch Zusatz gewisser Substanzen, nämlich unter Hinzufügen von Alkali verhindern, kompliziert aber die Methode.

Manchmal wiederum erscheint es aber zweckmäßiger, die Ver-

aschung unter Hinzufügen von oxydierenden Stoffen auszuführen.
Folglich ergibt sich bei der trockenen Veraschung hinsichtlich der Arbeitsmethode zweierlei Möglichkeiten:

1) die trockene Veraschung ohne jeden Zusatz
2) die trockene Veraschung unter Zusatz von Chemikalien.

Als weiteren Punkt würde bei der Anwendung dieser trockenen Veraschung die Verlängerung des zeitlichen Arbeitsganges eine nicht unbedeutende Rolle spielen. Denn vor der Veraschung muß das bestimmte Material zuerst im Trockenschrank bei einer Temperatur von 105 bis 110 Grad getrocknet werden. Flüssigkeiten werden demgemäß auf einem Wasserbad eingetrocknet.

Demgegenüber steht die Veraschung auf nassem Wege. Erstmalig wurde die Art der Veraschung durch Verwendung von Schwefelsäure und ebenso Salpetersäure von NEUMANN (9) beschrieben. Dabei ergab sich, daß der mit S c h w e f e l s ä u r e bestimmte Veraschungsweg vielseitig anzuwenden ist, dabei lassen sich sowohl Kationen als auch Anionen nachweisen. Die Veraschungsmethode nach NEUMANN (9) ist in der Handhabung einfacher und praktischer und erfordert vor allem keinen großen Zeitaufwand. Sie stellt also gleichsam für die Zwecke die Methode der Wahl dar.
Von Vorteil ist ferner noch die Bedienung von Katalysatoren zur Veraschungslösung, da hierdurch der Veraschungsweg wesentlich verkürzt und damit der Zeitaufwand geringer gestaltet werden kann. Die Menge der hinzugefügten Katalysatoren, Kupfersulfat und Kaliumsulfat, steht im Verhältnis 3:1.

Rückblickend auf die beiden erwähnten Möglichkeiten einer Veraschung ist also zu sagen, daß die Veraschung auf nassem Wege vielfach der trockenen vorzuziehen ist. Denn durch die Gegenüberstellung beider Arbeitsmethoden erwies sich die nasse Veraschung als die einfachere und vorteilhaftere Methode. Nicht zuletzt, was gerade heute in einem ständig ansteigenden Maße ausschlaggebend ist - Mangel an Zeit - benötigt gerade diese Methode keinen großen Zeitaufwand.

Nach einer eingehenden Betrachtung über die Notwendigkeit des Enteiweißungsmittels und ebenfalls die geeignete Wahl der Veraschung wollen wir den gesamten Vorgang einer Rest-Stickstoffbestimmung näher erläutern.

Das intravenös abgenommene Blut wird unmittelbar danach ins Labor gebracht und sogleich verarbeitet. Das im Reagenzglas befindliche Blut wird zuerst mittels eines Holzstäbchens kräftig durchmischt und anschließend läßt man 10 Minuten zentrifugieren, um quantitätsmäßig möglichst viel und insbesondere ein klares, gelblich schimmerndes Serum zu gewinnen. Nach dem Zentrifugieren gibt man das abzentrifugierte Serum mittels einer kleinen Saugpipette in ein sauber gereinigtes Reagenzglas. Der weitere Arbeitsgang vollzieht sich unter dem Begriff Serum-Enteiweißung.
Es werden 3 ccm Serum mit 6 ccm 25 %iger Trichloressigsäure und weiteren 6 ccm destilliertem Wasser in ein Reagenzglas gegeben. Die im Reagenzglas befindliche Lösung wird wiederum mit einem Holzstäbchen mehrmals umgerührt, so daß die Durchmischung und die Enteiweißung durch das Fällungsmittel sich reaktionsmäßig richtig vollziehen kann. Danach filtriert man die gesamte Lösung durch ein trockenes, sogenanntes Faltenfilter, in ein zweites Reagenzglas.
Der nächste Schritt bei der Bestimmung des Rest-Stickstoffes nach KJELDAHL (3) ist der Veraschungsvorgang. Man gibt in den Veraschungskolben zuerst einige Körnchen, etwa eine Messerspitze, Kupfersulfat und Kaliumsulfat. Diese beiden Salze haben bei der sich abspielenden Reaktion die Funktion als Katalysatoren. Dann entnimmt man mittels einer Vollpipette 1 ccm konzentrierte Schwefelsäure und gibt diese in den Veraschungskolben. Das in der Zwischenzeit gewonnene Filtrat wird ebenfalls mit einer 5 ccm Vollpipette aus dem Reagenzglas aufgezogen und läßt dieses Filtrat zu den übrigen genannten Substanzen in den Veraschungskolben zulaufen. Bei der Verwendung der jeweils zur Verfügung stehenden Pipetten soll nach Möglichkeit auf den Gebrauch einer Vollpipette wegen ihrer Genauigkeit zurückgegriffen werden. Der Veraschungskolben wird dann zum Sieden erhitzt, ungefähr

15 bis 20 Minuten lang, so daß das Lösungsmaterial verascht ist. Die Veraschungslösung weist zu Beginn der Veraschung eine bläulich schimmernde Farbe auf - dies bedingt durch das Kupfersulfat - und nimmt im Laufe der Veraschung einen bräunlich-schwarzen Farbton an, bedingt durch Kohlenstoff. Am Ende der Reaktion zeigt sich eine farblose oder teils ins schwach grünlich reichende Veraschungslösung. Nach der Veraschung läßt man das gesamte Gemisch erkalten, um dann später mit der Destillation anfangen zu können.

Als weiterer Abschnitt in der Rest-Stickstoff-Bestimmung reiht sich der Vorgang der Destillation an.
Zuerst wird das Wasser der Destillationsanlage zum Kochen gebracht unter gleichzeitiger Inbetriebnahme einer Wasserkühlung, die man mäßig stark laufen läßt. Bevor aber die Veraschungslösung in den Trichter zur Destillation kommt, schließt man sozusagen eine "Vorlage" an. Es werden 10 ccm n/100 Schwefelsäure, die vorher selber zubereitet wurde, mit einer 10 ccm Vollpipette entnommen. Diese 10 ccm n/100 Schwefelsäure wird als die gewählte Vorlage in einen Meßkolben gefüllt unter gleichzeitigem Hinzufügen von 2 bis 3 Tropfen eines Indikators.
Als Indikator wählten wir das Tashiro-Reagens, welches sich zusammensetzt aus 100 ccm 0,03 %iger alkoholischer Methylrotlösung und 15 ccm Methylenblaulösung. Der sich dabei ergebende Farbton nimmt eine weinrote, eher ins violette neigende Farbe an.
Dann wird die Vorlage mit dem beschriebenen Inhalt an die Destillation angeschlossen. Hierbei ist wiederum notwendig und stets darauf zu achten, daß das Ausflußrohr des Kühlers in die Schwefelsäure eintaucht. Bei Nichtbeachtung dieser Vorschrift kann der im Laufe der Destillation gebildete Ammoniak entweichen und geht somit dem zu erwartenden Resultat verloren.
Dann bringt man die Veraschungslösung nach vorherigem Verdünnen mit einigen Kubikzentimeter destilliertem Wasser durch den Trichter in den Destillationskolben und spült hinterher den Veraschungskolben sowie den Trichter mit destillier-

tem Wasser nach, so daß alle noch irgendwo haftenden Substanzen auch wirklich in den Destillationskolben gelangen. Dann läßt man 5 Minuten zur Erwärmung der Apparatur destillieren. Nach Beendigung dieser Zeit gibt man mittels einer Vollpipette 5 ccm einer 33 %igen Natronlauge durch den Trichter hinzu, spült hinterher wieder mit Aqu.dest. nach und läßt nun weitere 5 Minuten destillieren.
Nach Beendigung des Destillationsvorganges wird vorsichtig die Vorlage von dem Kühlerrohr getrennt, unter gleichzeitigem Abspülen des Kühlerrohres von außen mit einer Spritzflasche.

Als letzter arbeitsmäßig bedingter Vorgang bei der Rest-Stickstoffbestimmung schließt sich die Titration an.

Von besonderer Bedeutung und demgemäß von ausschlaggebender Wichtigkeit ist einerseits die vorher zu erfolgende Faktoreinstellung und andrerseits die Beurteilung einer genauen, ja diffizilen Ablesung der Werte an der Büretten-Skala.
Bei der Faktoreinstellung stellt man sich zuerst jeweils eine aus einer normalen Schwefelsäure und dasselbe gilt auch für die Natronlauge eine n/100 Schwefelsäure bzw. Natronlauge her. Dann füllt man die zwei Büretten, die wiederum mittels verstellbaren Gummirädchens an einem Eisengestell befestigt sind, mit den beiden oben erwähnten n/100 einer Normallösung. Nun läßt man nach vorheriger Skalaablesung eine bestimmte Menge der Natronlauge als Vorlage in einen 10 ccm Meßkolben einlaufen. Nach Schließen des in der Bürette eingebauten Hahnes wird der nun entstandene Wert an der Skala abgelesen. Dabei ist aber stets darauf zu achten, daß man nach Senkung des Flüssigkeitsspiegels eine geraume Zeit verstreichen läßt und erst dann den Wert abliest. Durch die teilweise schnell ablaufende Flüssigkeit ergeben sich innerhalb der Bürette Schwankungen infolge der an der Wandung der Bürette nachfließenden Flüssigkeitsreste, so daß bei unmittelbarem Ablesen sehr leicht Wertdifferenzen entstehen können, die durch vorherige Beachtung doch auszuschließen sind. Unter Hinzufügen von 2 bis 3 Tropfen Tashiro-Reagens, das hier ebenfalls als Indikator verwendet wurde, nimmt dieser bei

der Natronlauge nun einen intensiv grünen Farbton an. Der Zweck des Indikators ist wieder die Erkennung des Farbumschlages bei der Rücktitration.
Bei Beginn der Rücktitration wird wieder der Wert an der Bürette abgelesen, in der nun die n/100 Schwefelsäure vorliegt. Dann läßt man langsam, am besten tropfenweise die n/100 Schwefelsäure unter gleichzeitigen pendelnden Bewegungen des Meßkolbens in die Natronlauge einlaufen. Bei erfolgtem Farbumschlag, der sich von farblos bis ins weinrote vollzieht, ist somit der Vorgang der Rücktitration beendet. Nun liest man erneut den Wert der hierzu benötigten Menge an Schwefelsäure an der Skala ab.
Die Berechnung des Faktors geht so vonstatten, daß man den Verbrauch der zur Rücktitration benötigten Schwefelsäure durch die bekannte Menge an vorgelegter Natronlauge dividiert. Der daraus sich errechnende Wert ergibt den Wert des F a k t o r s . Am besten ist aber zur Erzielung eines genauen Faktorwertes, daß man mengenmäßig verschiedene Vorlagen vorgibt, und anschließend mit der n/100 Schwefelsäure zurücktitriert. Die auf diese Weise gefundenen Faktorwerte werden tabellenmäßig aufgezeichnet. Der daraus resultierende Mittelwert ist der Faktor der Natronlauge.
Der hierbei errechnete Wert bei der Faktoreinstellung ist überaus wichtig, da dieser bei der eigentlichen Berechnung in Verbindung mit der Titration ausschlaggebend ist.
Dabei möchten wir nochmals gerade die Betonung auf eine exakte, ja gewissenhafte Durchführung einer Faktoreinstellung legen, da verschiedentlich in den Labors durch eine unsachgemäße Faktoreinstellung diese allzu leicht zustandekommende Fehlerquelle tatsächlich entstehen kann. Zweifelsohne ergeben sich dann bei der Berechnung der Rest-Stickstoffbestimmung ungenaue, ja fehlerhafte Werte, die den wirklichen nicht entsprechen.

Bei der Erläuterung der oben beschriebenen Faktoreinstellung tritt demgegenüber bei der Rest-Stickstoffbestimmung, inpuncto Rücktitration der Natronlauge, ein ähnlicher, arbeitsmäßig bedingter Verlauf auf.

Nach erfolgter Abnahme der Vorlage, unter mehrmaligem Abspritzen des Kühlerrohrs, wird diese mit der n/100 Natronlauge zurücktitriert. Auch hier liest man zu Beginn der Titration den Ausgangswert der Natronlauge an der Bürette ab. Dann läßt man unter denselben oben beschriebenen Arbeitsvorgang langsam, am besten tropfenweise die Natronlauge aus der Bürette zulaufen, bis eben der Farbumschlag von farblos, dann allmählich ins intensiv grün reichende, sich bildet. Zum Schluß wird der sich nunmehr ergebende Wert der Flüssigkeitssäule an der Bürette abgelesen.
Als letzter Schritt bei der Rest-Stickstoffbestimmung schließt sich somit die Berechnung des Rest-Stickstoffes an. Bei der Ausrechnung des Rest-Stickstoffes geht man nun so vor, daß zuerst die verbrauchte Menge an Natronlauge mit dem Faktor der Natronlauge multipliziert wird. Nach Errechnung dieses Wertes wird dieser von der bekannten Menge Schwefelsäure (10 ccm n/100 H_2SO_4), die als Vorlage diente, abgezogen. Der daraus sich ergebende Wert wird nun mit der Zahl 14 (Atomgewicht des Stickstoffes) multipliziert und somit erhält man den Endwert der tatsächlich vorliegenden Rest-Stickstoffmenge im Blut, ausgedrückt in Milligramm-Prozent.

Bei der Anwendung einer Methode zur Rest-Stickstoffbestimmung nach KJELDAHL (3) hat sich aufgrund der im Labor anzahlmäßig in einer großen Breite durchgeführten Versuche ergeben, daß gerade diese Methode in ihrem gesamten Arbeitsgang nach genauer Befolgung und sachgemäßer Handhabung durchaus den Vorteil für eine Serien-Bestimmung aufweist.
Die Wahl dieser Rest-Stickstoffbestimmung nach KJELDAHL (3) schien uns, gestützt durch weitere Gesichtspunkte wie Zeitfaktor und Einfachheit der Ausführung, eben die bestgeeignete Methode für eine Serienbestimmung darzustellen. Nicht zuletzt haben wir uns mit den in der Literatur beschriebenen Erkenntnissen von FRIEDRICH (10), ANDERSEN und JENSEN (11) sowie KLINGMÜLLER (12) hinsichtlich der Beurteilung und Verwendbarkeit der kjeldahlometrischen Rest-Stickstoffbestimmung eingehend befaßt und wählten gerade diese Methode für eine Serienbestimmung.

IIb. Makromethode für H a r n s t o f f

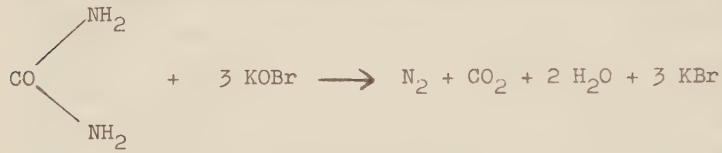
Da der Harnstoff den größten Teil des Rest-Stickstoffs ausmacht, war es für uns interessant zu erfahren, inwieweit eine Rest-Stickstoffbestimmung durch eine r e i n e Harnstoff-Bestimmung zu ersetzen wäre und welche Schwankungen anhand des Krankengutes durch eine alleinige Ausführung dieser Methode auftreten würden. Die Harnstoff-Bestimmung haben wir bisher routinemäßig in unserem Labor nach der Methode von KOWARSKY (4) mit dem Ureometer durchgeführt. Da die mit dieser Bestimmung erzielten Werte erfahrungsgemäß großen Schwankungen unterworfen sind, waren wir bestrebt, eine möglichst genauere Harnstoff-Analyse durchzuführen. Dabei bot sich das von der Firma Beckman in den Handel gebrachte Ultra-Micro-Analytical-System an, das aus einem Gerätesatz speziell für Ultra-Mikro-Analysen besteht. Ausschlaggebend dabei waren unsere Überlegungen, daß die Blutentnahme aus Ohrläppchen oder Fingerbeere möglich ist, was speziell bei Säuglingen und Kleinkindern, oder häufig zu kontrollierende Ergebnisse von großer Bedeutung ist.
Im einzelnen sollen nachfolgend die Harnstoff-Bestimmungen in den von uns gewählten Methoden aufgeführt werden.

Unter Harnstoff, chemisch definiert als Diamid der Kohlensäure, versteht man in physiologisch-chemischen Geschehen den in der Leber bei dem Eiweiß-Abbau freiwerdenden wichtigsten stickstoffhaltigen Stoffwechsel-Endprodukt, der mit dem Harn ausgeschieden wird. Definitionsgemäß gehört der Harnstoff-Stickstoff somit zu der Substanz der Rest-Stickstoffgruppe und er stellt gleichzeitig mengenmäßig den überwiegenden Anteil dieser Stoffgruppe dar.

Das Prinzip der Harnstoff-Bestimmung nach KOWARSKY (4) stützt sich auf die grundlegende Untersuchung von KNOOP und HÜFNER (13), die feststellten, daß bei Einwirkung von salpetriger Säure (HNO_2) oder eines Hypobromites der Harnstoff direkt in Stickstoff zerlegt werden kann.

Nach KOWARSKY (4) verwendet man das Kaliumhypobromit, das man durch Einleiten von Brom in eine Lösung von Kaliumbromid erhält. Die chemische Umsetzung geht offensichtlich so vonstatten, daß sich als nicht faßbares Produkt -Hydrazin- bildet, das als starkes Reduktionsmittel wiederum auf Hypobromit einwirkt.

Summarisch ergibt sich damit folgende chemische Reaktion:



$$CO(NH_2)_2 + 3\ KOBr \longrightarrow N_2 + CO_2 + 2\ H_2O + 3\ KBr$$

Das entstehende Kohlendioxyd wird sofort chemisch an Ätzkali gebunden und bleibt in der Lösung; während der Stickstoff als Gas aufsteigt und volumetrisch gemessen werden kann. SPAETH-KAISER (14).

Zur Berechnung des Stickstoffs und demgemäß des Harnstoffs ist die Kenntnis der Gasgesetze von Boyle-Mariotte und Gay-Lussac unerläßlich.
Aus diesen Gesetzen leitet sich die Abhängigkeit eines Gasvolumens von der Temperatur und den auf das Gas wirkenden Außendruck ab. Wobei nach Boyle-Mariotte das Volumen eines Gases umgekehrt proportional dem Druck bei konstanter Temperatur ist. Während nach Gay-Lussac das Volumen direkt proportional der Temperatur sich ändert.
Daraus leitet sich die Forderung bei der Methode nach KOWARSKY (4) ab, daß bei der Ablesung des sich aus Harnstoff gebildeten Stickstoff-Volumens unbedingt die herrschende Außentemperatur und Atmosphärendruck mitgemessen wird.
Stöchiometrisch bildet sich aus einem Mol Harnstoff ein Mol Stickstoff. Nach dem Avogadro'schen Gesetz nimmt ein Mol eines Gases einen Raum von 22,4 Litern ein. Es lassen sich demnach Beziehungen zwischen dem entstandenen Stickstoff und der Harnstoffmenge aufstellen, so daß man rechnerisch auf die unbekannte Harnstoffmenge schließen kann.

Wir benutzten jedoch die von HENNING (15) angegebene Umrechnungstabelle.

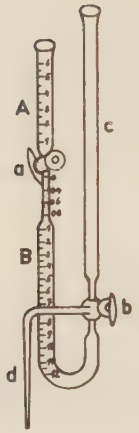
Vor Ausführung des Arbeitsganges bei der Harnstoff-Bestimmung nach KOWARSKY (4) stellt man zuerst eine gesättigte Lösung her. Diese Salzlösung besteht aus 150 g Kaliumsulfat und 350 g Natriumchlorid, gelöst in einem Liter Wasser. Diese Lösung dient als Sperrflüssigkeit in dem Ureometer und verhindert das Entweichen der bei der Reaktion entstehenden Stickstoffmenge.

Ein weiterer Arbeitsgang beruht auf der Herstellung der "Bromlauge". Dabei werden 40 g Kaliumbromid in 160 ccm Wasser gelöst und zu dieser Lösung werden 8 g flüssiges Brom unter dem Abzug untermischt. Diese Lösung läßt man in einer braunen Flasche im Eisschrank stehen, um eine Verflüchtigung des Broms zu vermeiden.
Nach Ausführung dieser für die Harnstoff-Bestimmung notwendigen Lösungen kann mit der Bestimmungs-Methode begonnen werden.

Das morgens nüchtern entnommene intravenöse Blut wird unmittelbar danach ins Labor gebracht und man läßt das Blut 10 Minuten lang zentrifugieren. Nach dem Zentrifugieren gibt man das gewonnene Serum in ein Reagenzglas. Aus diesem Reagenzglas zieht man 5 ccm Serum mittels einer Vollpipette auf und läßt den Inhalt in ein zweites Reagenzglas laufen. In dieses Reagenzglas gibt man mit einer Vollpipette die gleiche Menge an 10 %iger Trichloressigsäure zur Enteiweissung. Den Inhalt dieses Reagenzglases schüttelt man kräftig durch und filtriert anschließend durch ein Faltenfilter.

In der Zwischenzeit wird der Ureometer (das U-Rohr) gasblasenfrei mit der gesättigten Salzlösung gefüllt, die aus Kaliumsulfat und Natriumchlorid besteht, welche die Funktion einer Sperrflüssigkeit gegenüber dem Stickstoff haben.

Nach Einfüllen der gesättigten Lösung verschließt man den Hahn a, der am Übergang von dem Trichter zum Teil B des



U-Rohres sich befindet. Dann reinigt man den Trichter (Teil A) mittels eines ausgezogenen Glasrohres mit Wasser und spült mehrmals den Trichter aus. Nun gibt man in den Teil A 3 ccm Filtrat und läßt dieses langsam in den Teil B des U-Rohres zur gesättigten Lösung zufließen. Den Dreiweghahn ("b") stellt man nun so, daß Ausfluß und Schenkel B des U-Rohres verbunden wird. Jetzt läßt man 3 ccm Serum-Filtrat unter langsamen, vorsichtigen Öffnen des Hahnes in den Schenkel B eintreten. Dann sofortiges Schließen des Hahnes und abermals wird der Trichter mittels einer Wasserstrahlpumpe gesäubert.

Der nächste Schritt des Arbeitsganges vollzieht sich in der Herstellung der sogenannten "Bromlauge". Aus der Bromflasche entnimmt man 3 ccm dieser Lösung mit einer Vollpipette und gibt diese unter Hinzufügen der gleichen Menge einer 10 %igen Natronlauge in ein bereitstehendes Reagenzglas. Den Inhalt schüttelt man nun durch und bringt 6 ccm "Bromlauge" in den Trichter des Ureometers. Unter vorsichtigem Öffnen des Hahnes läßt man diese "Bromlauge" langsam in den Schenkel B einlaufen. Durch Drehen des Dreiweghahnes wird aus C soviel Sperrflüssigkeit abgelassen, daß der Flüssigkeitsspiegel im Schenkel B und C gleich hoch ist, wenn beide Schenkel über B kommunizieren. Schon nach geraumer Zeit sieht man in dem Schenkel B ein deutliches Aufperlen winzig kleiner Gasblasen. Zur Beschleunigung der Reaktion kann durch leises Beklopfen der Schenkelwand beigetragen werden. Die gesamte Reaktion der Harnstoff-Bestimmung ist nach 20 Minuten beendet.

Nach Beendigung der Reaktion schließt sich der Teil der Berechnung an. Zuerst stellt man das Gasvolumen fest, das sich im Laufe der Reaktion gebildet hat. Dann ermittelt man an Hand des aufgestellten Barometers den jeweiligen Atmosphärendruck und liest an dem Thermometer den im Laborraum ergebenden Grad der Temperatur ab.
Aus der Tabelle wird dann aufgrund der verschiedenen Barometer- und Temperatur-Werte, der bei dem Versuch festgestellte Wert abgelesen und so läßt sich der für die spätere Ausrechnung erforderliche Faktor-Wert ermitteln.
Nach Ablesung des gebildeten Gasvolumens entnimmt man aus der Tabelle den entsprechenden Faktor.
Den Harnstoffgehalt in 100 ccm Serum erhält man durch Multiplikation des Stickstoff-Volumens in Kubikzentimeter mit dem Faktor.
Bei Verwendung des angegebenen Filtrats erhält man die Harnstoff-Menge in Milligramm-Prozent.

IIc. Mikromethode für H a r n s t o f f

Zum Vergleich der eben beschriebenen Makro-Methode verwendeten wir eine Ultra-Mikro-Methode, die auf kolorimetrischer Messung beruht. Die Farbstoff-Reaktion wird hierbei mittels Diazetylmonoxim hervorgerufen. Diese Methode beruht auf einer zuerst von FEARON (16) beschriebenen Methode, der angab, daß Harnstoff in saurer Lösung mit Diazetylmonoxim eine gelbe Farbe entwickelt.

WHEATLY (17) konnte nachweisen, daß in Anwesenheit von aromatischen Amine eine rote Farbe sich entwickelt. BARKER (18) bestimmte die Nachweisbarkeitsgrenze bei 10 bis 150 mg Harnstoff-Stickstoff.
All die beschriebenen Reaktionen sind jedoch nicht spezifisch, sondern reagieren auch mit Harnstoff-Derivaten, z.B. Zitrullin. FEARON (16) nennt diese Farbreaktion auch Karbamino-Diazetyl-Reaktion, da offenbar alle Verbindungen mit

der A t o m - K o n f i g u r a t i o n

R - NH - CO - NH - R

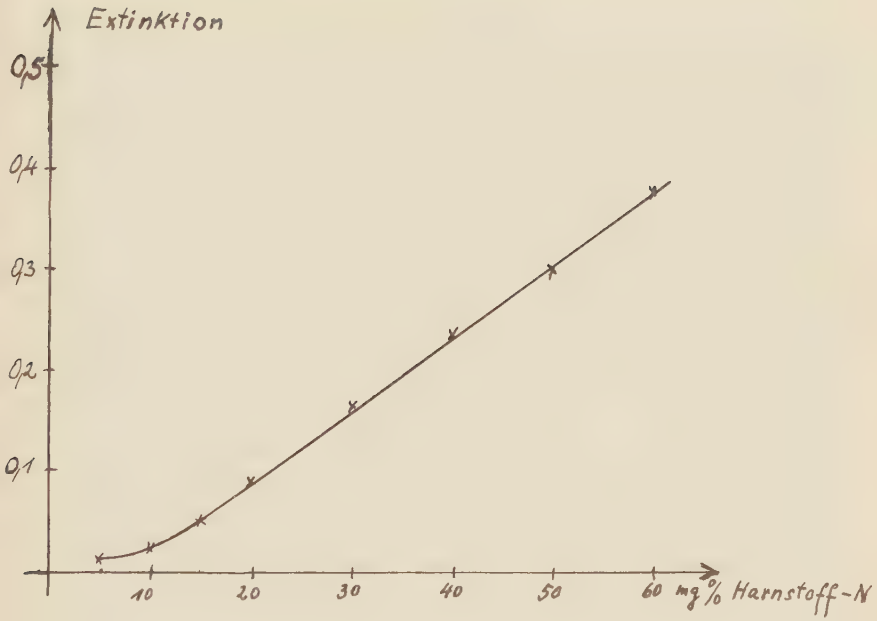
die gelbe Farbe entwickeln.
Nach ROSENTHAL (19) ist jedoch ein Reaktions-Milieu von 3,8 n HCl enthaltend 0,08 n Arsensäure optimal für die Harnstoff-Bestimmung.
Da unter den genannten Bedingungen nur Harnstoff eine Farbe mit einem Absorptions-Maximum bei 480 bis 485 mμ zeigt, während Zitrullin und andere Carbamyl-Verbindungen Farben mit einem Absorptions-Maximum bei 540 mμ bewirken.

Vor Anwendung jeder kolorimetrischen Bestimmungs-Methode ist an Hand von Verdünnungsversuchen zu prüfen, inwieweit eine Farbe gebende Reaktion in ihrer Farbtiefe mit der Konzentration des zu untersuchenden Stoffes zunimmt. Für einwandfreie quantitative Ergebnisse ist zu fordern, daß die Farbtiefe der Konzentration proportional verläuft und damit dem Lambert-Beer'schen Gesetz unterliegt.
FRIEDMANN (20) konnte bei seinen Experimenten nachweisen, daß das Lambert-Beer'sche Gesetz nur in den Konzentrationen von 10 bis 50 mg % gilt und daß der Kurvenverlauf in den übrigen Bereichen abweicht.

Vor Durchführung unserer Versuche stellten auch wir zunächst eine Eich-Kurve auf und stellten uns dazu eine Lösung her, die in 1000 ccm destilliertem Wasser 2,144 g Harnstoff enthält. Es handelt sich also hierbei um eine 100 mg %ige Harnstoff-Stickstoff-Lösung.

Hiervon wieder stellten wir eine Verdünnungsreihe von 5 bis 60 mg % Harnstoff-N auf und prüften den Verlauf der Eichkurve, die in der nachfolgenden Abbildung wiedergegeben ist.

Aus ihr ist die Gültigkeit des Beer'schen Gesetzes in dem Bereich von 12,5 bis 60 mg % ersichtlich und damit auch die Übereinstimmung mit den von FRIEDMANN (20) gefundenen Werten.



Die Bestimmungs-Methode im einzelnen ergibt folgenden Verlauf: Mit einer Pinco-10 µl Pipette entnimmt man 10 µl dest. Wasser und gibt dieses in das erste leere Mikro-Teströhrchen. Mit der gleichen 10 µl Pipette wird aus der 10 %igen Harnstoff-Lösung dieselbe Menge entnommen und man gibt es in das zweite leere Test-Röhrchen. Dann pipettiert man aus der 20 %igen Harnstoff-Lösung wiederum 10 µl und gibt es in das dritte Mikro-Röhrchen. In das vierte leere Test-Röhrchen pipettiert man mit der 10 µl das Serum, das als Probe dienen soll.

Nun werden in allen vier Mikro-Teströhrchen mittels einer 40 µl Pipette Trichloressigsäure gebracht.

Nach Verschließen der vier Teströhrchen läßt man die Garnitur mit einem Mikro-Mixer zuerst 30 Sekunden lang durchmischen, und anschließend wird 30 Sekunden lang zentrifugiert. Der weitere Arbeitsgang wird mittels einer 20 µl Übertra-

gungspipette (Transfer-Pipette) ausgeführt. Nach Köpfen der Plastik-Teströhrchen werden genau 20 µl, mit einer Transfer-Pipette in vier bereitstehende, trockene Teströhrchen übertragen. Dann pipettiert man mit einer 20 µl Pipette, welche an dem Diazetylmonoxim-Fläschchen angeschlossen ist, jeweils 20 µl Diazetylmonoxim in die vier bereitstehenden Test-Röhrchen. Der weitere Schritt vollzieht sich nun so, daß 40 µl Arsenschwefelsäure aus dem betreffenden Fläschchen in die vier Mikro-Röhrchen übertragen werden. Zum Schluß kommen 180 µl destilliertes Wasser in die einzelnen Test-Röhrchen. Nach Verschließen der Test-Röhrchen durchmischt man mittels des Mikro-Mixers 30 sec. lang und nachher läßt man den Satz der Test-Röhrchen 30 sec. zentrifugieren.
In der Zwischenzeit bereitet man ein Wasserbad vor, dazu füllt man ein 100 ml großes Becherglas bis ungefähr 1 cm unter dem Becherrand mit Wasser und erhitzt bis zum gelinden Sieden. Die vorher durchmischten und zentrifugierten vier Test-Röhrchen setzt man nun in einem Metallstreifen ein, in der Art, daß man das Loch gegenüber der Streifenbeschriftung freiläßt.
Nun bringt man die vier Mikro-Teströhrchen in das Wasserbad und läßt diese 20 Minuten lang kochen.

Es muß Sorge getragen werden, daß während des Erhitzens keine Flüssigkeitsverluste entstehen. Zu diesem Zwecke ist es ratsam, die im Metallstreifen befindlichen Test-Röhrchen mit einem Glasstöpsel zu beschweren. Auf diese Weise verhindert man ein Entweichen der Flüssigkeit, ferner ist darauf zu achten auf eine genaue Überwachung des Wasserspiegels, denn sonst würden durch Temperaturänderungen falsche Werte resultieren.

Nach dem Wasserbad bringt man die vier Teströhrchen sofort in einen mit kaltem Wasser angefüllten kleinen Meßbecher und läßt die Garnitur drei Minuten lang abkühlen. Dann wird der Satz wieder 30 Sekunden lang zentrifugiert und anschliessend mißt man mittels des Photometers in einer 0,1 Mikroliter-Küvette bei einer Wellenlänge von 475mµ die einzelnen Test-Röhrchen.

Vor Inbetriebnahme des Photometers muß dieser über längere Zeit eingeschaltet sein, um gewisse Wert-Schwankungen auszuschließen, bedingt durch thermische Veränderungen, besonders innerhalb der Lampe beim Anheizen.
Dann wird das Gerät auf den Wert 0 eingestellt, danach überprüft man den Ausschlag der Nadel an der gegenüberliegenden Seite der Skala. Nach genauer Einstellung des Photometers kann mit der eigentlichen Messung begonnen werden.

Zuerst wird der Blindwert bestimmt. Mit einer Polyäthylen-Pipette wird nach vorheriger Köpfung des Test-Röhrchens die Lösung in die Küvette des Photometers gebracht. Nach kurzer Zeit erfolgt der Ausschlag an der Skala, jeweils eine bestimmte Extinktion betreffend.
Aus dem zweiten Test-Röhrchen, das die 10 mg Harnstoff-Standard-Lösung enthält, wird diese ebenfalls in die Küvette eingefüllt. Wiederum mißt man den Wert des Ausschlages. Dabei ist aber zu beachten, daß man nicht sofort abliest, sondern eine geraume Zeit verstreichen läßt, so daß nun kein Ausschlag des Zeigers an der Skala mehr zu erwarten ist. Mit zunehmender Farbentwicklung nehmen die Galvanometerausschläge ab. Der geringste Galvanometerausschlag wird dann notiert.
Für die nächste Meß-Bestimmung des anderen Test-Röhrchens muß die Küvette des Photometers stets gereinigt werden, indem zuerst mit destilliertem Wasser und dann mit Aceton nachgespült wird, so daß keine Substanz-Teile des vorher durchgeführten Versuches den nächstfolgenden wertmäßig verändert.
In der oben angegebenen Arbeitsweise erfolgen dann die weiteren Meß-Bestimmungen der 20 mg Harnstoff-Standardlösung sowie der der Probe.

Die Aufstellung der bei jeder Messung resultierenden Werte von $Standard_{10}$, $Standard_{20}$ und der Probe ist für die Bestimmung der Harnstoff-Stickstoff-Werte erforderlich.

Die Bestimmung des Harnstoff-Stickstoffs erfolgt nach einer Formel, die von Beckman angegeben ist.

$$\frac{\text{Probe} + \text{Standard}_{20} - 2 \times \text{Standard}_{10}}{\text{Standard}_{20} - \text{Standard}_{10}} \times 10 = \text{mg Harnstoff-N/100 ml}$$

Gleichzeitig bestimmten wir aber auch die Werte nach der Eich-Kurve, um eventuelle Schwierigkeiten zu eruieren.

III. Experimentelle Ergebnisse

Die mit den vorgenannten Methoden bestimmten und erhaltenen Rest-Stickstoff - und Harnstoff-Werte sind in den nachfolgenden Tabellen, einschließlich der für die Statistik notwendigen Berechnungen enthalten.

IIIa. Tabelle 1: Rest-Stickstoff

Versuchs-person	Alter	Rest-N mg %	Abweichung von Mittelwert (x - M)	quadratische Abweichung $(x - M)^2$
1	52	29,26	2,20	4,8399
2	57	35,84	4,38	19,1860
3	31	32,20	0,74	0,5476
4	40	29,00	2,46	6,0517
5	47	31,92	0,46	0,2116
6	58	23,10	8,36	69,8900
7	54	23,70	7,76	60,2135
8	46	30,80	0,66	0,4356
9	44	28,00	3,46	11,9720
10	25	21,70	9,76	95,2580
11	41	23,38	8,08	65,2828
12	63	48,30	16,84	283,5800
13	26	33,04	1,58	2,4964
14	57	29,40	2,06	4,2437
15	31	25,90	5,56	30,9136
16	54	22,40	9,06	82,0836
17	37	35,00	3,54	12,5316
18	38	27,02	4,44	19,7136
19	43	42,00	10,54	111,0916
20	22	24,50	6,96	48,4416
21	33	42,28	10,82	117,0724
22	65	54,60	23,14	535,4596
23	45	32,62	1,16	1,3456
24	65	38,50	7,04	49,5616
25	61	37,10	5,64	31,8096
26	22	25,20	6,26	39,1876
27	55	32,48	1,02	1,0404
28	41	22,40	9,06	82,0836
29	42	22,40	9,06	82,0836
30	32	15,82	15,64	244,6096

IIIa. Tabelle 1: Rest-Stickstoff

Versuchs-person	Alter	Rest-N mg %	Abweichung von Mittelwert (x - M)	quadratische Abweichung $(x - M)^2$
31	49	44,24	12,78	163,3284
32	53	28,98	2,48	6,1504
33	65	36,96	5,50	30,2500
34	41	25,20	6,26	39,1876
35	65	24,92	6,54	42,7716
36	50	32,20	0,74	0,5476
37	55	51,80	20,34	413,7156
38	64	29,40	2,06	4,2436
39	44	33,60	2,14	4,5796
40	40	23,80	7,66	58,6756
41	33	24,08	7,38	54,4644
42	61	35,42	3,96	15,6816
43	32	25,20	6,26	39,1876
44	36	49,00	7,54	56,8516
45	58	40,88	9,42	88,7364
46	65	30,80	0,66	0,4356
47	64	40,60	9,14	83,5396
48	53	22,40	9,06	82,0836
49	64	27,30	4,16	17,3056
50	20	26,60	4,86	23,6196

IIIb. Tabelle 2: Harnstoff-Makromethode

Versuchs-person	Alter	Harnstoff n.Kowarsky mg %	Abweichung von Mittelwert (x - M)	quadratische Abweichung $(x - M)^2$
1	52	10,92	5,33	28,4089
2	57	15,81	0,44	0,1936
3	31	13,20	3,05	9,3025
4	40	16,06	0,19	0,3610
5	47	15,12	1,13	1,2769
6	58	15,47	0,78	0,6084
7	54	10,98	5,27	27,7729
8	46	15,20	1,05	1,1025
9	44	15,30	2,95	8,7025
10	25	13,44	2,81	7,8961
11	41	9,84	6,41	41,0881
12	63	23,28	7,03	49,4209
13	26	19,40	3,15	9,9225
14	57	23,04	6,79	46,1041
15	31	7,68	8,57	73,4449
16	54	9,60	6,65	44,2225
17	37	13,16	3,09	9,5481
18	38	15,04	1,21	1,4641
19	43	20,68	4,43	19,6249
20	22	16,92	0,67	0,4489
21	33	19,00	2,75	7,5625
22	65	43,70	27,45	753,5025
23	45	7,60	8,65	74,8225
24	65	11,40	4,85	23,5225
25	61	28,50	12,25	150,0625
26	22	18,05	1,80	3,2400
27	55	11,40	4,85	23,5225
28	41	13,95	2,30	5,2900
29	42	11,34	4,91	24,1081
30	32	7,56	8,69	75,5161

IIIb. Tabelle 2: Harnstoff-Makromethode

Versuchs-person	Alter	Harnstoff n.Kowarsky mg %	Abweichung von Mittelwert (x - M)	quadratische Abweichung $(x - M)^2$
31	49	18,80	2,55	6,5025
32	53	22,56	6,31	39,8161
33	65	14,16	2,09	4,3681
34	41	15,04	1,21	1,4641
35	65	18,80	2,55	6,5025
36	50	11,28	4,97	24,7009
37	55	22,56	6,31	39,8161
38	64	16,92	0,67	0,4489
39	44	15,98	0,27	0,7290
40	40	9,40	6,85	49,9225
41	33	15,92	0,33	0,1089
42	61	18,90	2,65	7,0225
43	32	10,39	5,86	34,3396
44	36	24,57	8,32	69,2224
45	58	17,01	0,76	0,5776
46	65	18,80	2,55	6,5025
47	64	28,20	1,95	3,8025
48	53	13,28	2,97	8,8209
49	64	15,04	1,21	1,4641
50	20	13,28	2,97	8,8209

IIIc. Tabelle 3: Harnstoff-Mikromethode
Berechneter Wert nach Fearon

Versuchs-person	Alter	Harnstoff berechneter Wert n.Fearon	Abweichung von Mittelwert (x - M)	quadratische Abweichung $(x - M)^2$
1	52	18,4	24,50	600,2500
2	57	29,1	13,80	190,4400
3	31	8,5	34,40	1183,3600
4	40	43,5	0,60	0,3600
5	47	69,4	26,50	702,2500
6	58	53,6	10,70	114,4900
7	54	49,5	6,60	43,5600
8	46	37,5	5,40	29,1600
9	44	55,9	13,00	169,0000
10	25	57,8	14,90	222,0100
11	41	15,8	27,10	734,4100
12	63	57,0	14,10	198,8100
13	26	43,7	0,80	0,6400
14	57	30,0	12,90	166,4100
15	31	27,4	15,50	240,2500
16	54	32,1	10,80	116,6400
17	37	25,9	17,00	289,0000
18	38	36,0	6,90	47,61000
19	43	36,4	6,50	42,2500
20	22	58,7	15,80	219,6400
21	33	43,5	0,60	0,3600
22	65	81,0	38,10	1451,6100
23	45	38,6	4,30	18,4900
24	65	40,3	2,60	6,7600
25	61	49,9	7,00	49,0000
26	22	25,5	17,40	302,7600
27	55	26,6	16,30	265,6900
28	41	41,6	1,30	1,6900
29	42	13,5	29,40	864,3600
30	32	21,4	21,50	462,2500

IIIc. Tabelle 3: Harnstoff-Mikromethode
Berechneter Wert nach Fearon

Versuchs-person	Alter	Harnstoff berechneter Wert n.Fearon	Abweichung von Mittelwert (x - M)	quadratische Abweichung $(x - M)^2$
31	49	24,6	18,30	334,8900
32	53	47,1	4,20	17,6400
33	65	91,3	48,40	2342,5600
34	41	58,1	15,20	231,0400
35	65	45,2	2,30	5,2900
36	50	18,2	24,70	610,0900
37	55	32,2	10,70	114,4900
38	64	40,3	2,60	6,7600
39	44	72,9	30,00	900,0000
40	40	28,5	14,40	207,3600
41	33	60,7	17,80	316,8400
42	61	58,3	15,40	237,1600
43	32	25,3	17,60	309,7600
44	36	27,4	15,50	240,2500
45	58	81,5	38,60	1489,9600
46	65	41,4	1,50	2,2500
47	64	85,4	42,50	1806,2500
48	53	85,7	42,80	1831,8400
49	64	30,4	12,50	156,2500
50	20	24,8	18,10	327,6100

IIIc. Tabelle 4: Harnstoff-Stickstoff Mikromethode

Berechneter Wert nach Fearon

Versuchs-person	Alter	Harnstoff-N berechneter Wert n.Fearon mg %	Abweichung von Mittelwert (x - M)	quadratische Abweichung $(x - M)^2$
1	52	8,6	11,47	131,5609
2	57	13,6	6,47	41,8609
3	31	4,0	16,07	258,2449
4	40	20,03	0,04	0,0016
5	47	32,4	12,33	152,0289
6	58	25,0	4,93	24,3049
7	54	23,1	3,03	9,1809
8	46	17,5	2,57	6,6049
9	44	26,1	6,03	36,3609
10	25	27,0	6,93	48,0249
11	41	7,4	12,67	160,5289
12	63	26,6	6,53	42,6409
13	26	20,4	0,33	0,1089
14	57	14,0	6,07	36,8449
15	31	12,8	7,27	52,8529
16	54	15,0	5,07	25,7049
17	37	12,1	7,97	63,5209
18	38	16,8	3,27	10,6929
19	43	17,0	3,07	9,4249
20	22	27,4	7,33	53,7289
21	33	20,3	0,23	0,0529
22	65	38,0	17,93	321,4849
23	45	18,0	2,07	4,2849
24	65	18,8	1,27	1,6129
25	61	23,3	3,23	10,4329
26	22	11,9	8,17	66,7489
27	55	12,4	7,67	58,9289
28	41	19,4	0,67	0,4489
29	42	6,3	13,77	189,6129
30	32	10,0	10,07	101,4049

IIIc. Tabelle 4: Harnstoff-Stickstoff Mikromethode
Berechneter Wert nach Fearon

Versuchs-person	Alter	Harnstoff-N berechneter Wert n.Fearon mg %	Abweichung von Mittelwert (x - M)	quadratische Abweichung $(x - M)^2$
31	49	11,5	8,57	73,4449
32	53	22,0	1,93	3,7249
33	65	42,6	22,53	507,6009
34	41	27,1	7,03	49,4209
35	65	21,1	1,03	1,0609
36	50	8,5	11,57	133,8649
37	55	15,0	5,07	25,7049
38	64	18,8	1,27	1,6129
39	44	34,0	13,93	194,0449
40	40	13,3	6,77	45,8329
41	33	28,3	8,23	67,7329
42	61	27,2	7,13	50,8369
43	32	11,8	8,27	68,3929
44	36	12,8	7,27	52,8529
45	58	38,0	17,93	321,4849
46	65	19,3	0,77	0,5929
47	64	41,2	21,13	446,4769
48	53	40,0	19,93	397,2049
49	64	14,2	5,87	34,4569
50	20	11,6	8,47	71,7409

IIIc. Tabelle 5: Harnstoff - Mikromethode

Abgelesener Wert nach Eichkurve

Versuchs-person	Alter	Harnstoff abgelesener Wert n.Eich-kurve mg%	Abweichung von Mittelwert (x - M)	quadratische Abweichung $(x - M)^2$
1	52	17,1	25,66	658,4356
2	57	28,9	13,86	192,0996
3	31	12,8	29,96	897,6016
4	40	43,9	1,14	1,2996
5	47	69,6	26,84	720,3856
6	58	56,8	14,05	197,4025
7	54	52,5	9,74	94,8676
8	46	39,6	3,16	9,9856
9	44	56,8	14,04	197,1216
10	25	56,8	14,04	197,1216
11	41	13,9	28,86	832,8996
12	63	56,8	14,04	197,1216
13	26	42,8	0,04	0,0016
14	57	31,1	11,66	135,9556
15	31	27,8	14,96	223,8016
16	54	34,3	8,46	71,5716
17	37	25,7	17,06	291,0436
18	38	35,3	7,46	55,6516
19	43	36,4	6,36	40,4496
20	22	57,8	15,04	226,2016
21	33	43,9	1,14	1,2996
22	65	81,0	38,24	1462,2976
23	45	36,4	6,36	40,4496
24	65	37,5	5,26	27,6676
25	61	50,3	7,54	56,8516
26	22	25,7	17,06	291,0436
27	55	25,7	17,06	291,0436
28	41	41,8	0,96	0,9216
29	42	15,0	27,76	770,6176
30	32	22,5	20,26	410,4676

IIIc. Tabelle 5: Harnstoff - Mikromethode

Abgelesener Wert nach Eichkurve

Versuchs-person	Alter	Harnstoff abgelesener Wert n.Eich-kurve mg%	Abweichung von Mittelwert (x - M)	quadratische Abweichung $(x - M)^2$
31	49	24,6	18,16	329,7856
32	53	47,1	4,34	18,8356
33	65	91,1	48,34	2336,7556
34	41	51,5	8,74	76,3876
35	65	46,1	3,34	11,1556
36	50	17,1	25,66	658,4356
37	55	32,2	10,56	111,5136
38	64	39,6	3,16	9,9856
39	44	71,8	29,04	843,3216
40	40	19,9	22,86	522,5796
41	33	60,0	17,24	297,2176
42	61	57,8	15,04	226,2016
43	32	24,6	18,16	329,7856
44	36	26,8	15,96	254,7216
45	58	81,5	38,74	1500,7876
46	65	41,8	0,96	0,9216
47	64	86,8	44,04	1939,5216
48	53	85,7	42,94	1843,8436
49	64	31,1	11,66	135,9556
50	20	24,6	18,16	329,7856

IIIc. Tabelle 6: Harnstoff-Stickstoff Mikromethode
Abgelesener Wert nach Eichkurve

Versuchs-person	Alter	Harnstoff-N abgelesener Wert n.Eich-kurve mg%	Abweichung von Mittelwert (x - M)	quadratische Abweichung $(x - M)^2$
1	52	8,0	12,07	145,6849
2	57	13,5	6,57	43,1649
3	31	6,0	14,07	197,9646
4	40	20,05	0,02	0,0004
5	47	32,5	12,43	154,5049
6	58	26,5	6,43	41,3449
7	54	24,5	4,43	19,6249
8	46	18,5	1,57	2,4649
9	44	26,5	6,43	41,3449
10	25	26,5	6,43	41,3449
11	41	6,5	13,57	184,1449
12	63	26,5	6,43	41,3449
13	26	20,0	0,07	0,0049
14	57	14,5	5,57	31,0249
15	31	13,0	7,07	49,9849
16	54	16,0	4,07	16,5649
17	37	12,0	8,07	65,1249
18	38	16,5	3,57	12,7449
19	43	17,0	3,07	9,4249
20	22	27,0	7,07	49,9849
21	33	20,5	0,43	0,1849
22	65	38,0	17,93	321,4849
23	45	17,0	3,07	9,4249
24	65	17,5	2,57	6,6049
25	61	23,5	3,43	11,7649
26	22	12,0	8,07	65,1249
27	55	13,12	6,95	48,3025
28	41	19,5	0,57	0,3249
29	42	7,0	13,07	170,8249
30	32	10,5	9,57	91,5849

IIIc. Tabelle 6: Harnstoff-Stickstoff Mikromethode

Abgelesener Wert nach Eichkurve

Versuchs-person	Alter	Harnstoff-N abgelesener Wert n.Eich-kurve mg%	Abweichung von Mittelwert (x - M)	quadratische Abweichung $(x - M)^2$
31	49	11,5	8,57	73,4449
32	53	22,0	1,93	3,7249
33	65	42,5	22,43	503,1049
34	41	24,0	3,93	15,4449
35	65	21,5	1,43	2,0449
36	50	8,0	12,07	145,6849
37	55	15,0	5,07	25,7049
38	64	18,5	1,57	2,4649
39	44	33,5	13,43	180,3649
40	40	14,0	6,07	36,8449
41	33	28,0	7,93	62,8849
42	61	27,0	6,93	48,0249
43	32	11,5	8,57	73,4449
44	36	12,5	7,57	57,3049
45	58	38,0	17,93	321,4849
46	65	19,5	0,57	0,3249
47	64	40,5	20,43	417,3849
48	53	40,0	19,93	397,2049
49	64	14,5	5,57	31,0249
50	20	11,5	8,57	73,4449

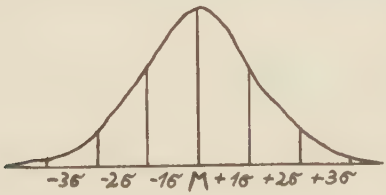
Bei der Erörterung statistischer Probleme geht es generell um die Frage der Übertragbarkeit, Voraussagbarkeit und Verallgemeinerungsfähigkeit von Untersuchungsergebnissen. Zunächst müssen jedoch erst einige notwendige Begriffe erörtert werden.
Zur Beschreibung von statistischem Material einer Beobachtungsreihe hat sich als praktisch und am gebräuchlichsten das arithmetische Mittel erwiesen, das definiert ist als:

$$M = \frac{\sum x}{n}$$

wobei n die Anzahl der untersuchten Gegenstände und x die Variable bedeuten. Dieser Wert jedoch genügt allein noch nicht zur Kennzeichnung eines statistischen Materials. Als zweckmäßig hat sich noch die Einführung der Standard-Abweichung vom Mittelwert erwiesen, deren Formel lautet:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (M-x)}{n}}$$

Diese Standard-Abweichung dient als Streuungsmaß um den Mittelwert.
Betrachtet man eine Beobachtungsreihe von unendlich großem n und setzt diese in Beziehung zu einem zu untersuchenden Wert und trägt die gefundenen Beobachtungen in ein Koordinaten-System ein, so ergibt sich eine charakteristische Glocken-Kurve (21) (G a u ß 'sche Kurve oder auch Normalverteilung genannt).



Aus dieser Kurve ergibt sich eine Häufigkeitsverteilung mit dem Maximum im Mittelwert und einer Standard-Abweichung von σ.

Nach der Wahrscheinlichkeit liegen im 1-σ Bereich 68 % der erhaltenen Ergebnisse, im 2-σ Bereich 98 % und im 3-σ Bereich 99,9 %; man spricht auch z.B. von einem 3-σ Verläßlichkeits-Intervall bei einem Verläßlichkeits-Niveau von 99,9 %.
In der Praxis und zur Berechnung hat es sich als günstig erwiesen, diese Werte zu standardisieren, wobei man den Mittelwert mit 0 und den σ -Bereich mit $\pm$ 1 annimmt.

Diese beschriebenen Verhältnisse gelten als Idealfall und sind für einige unendlich große Beobachtungsreihen (P o p u l a t i o n) gedacht. Meist wird es sich jedoch darum handeln, aufgrund von Stichproben Aussagen über die Population zu treffen.
Die Mittelwerte von zum Zwecke einer empirischen Erhebung ausgewählten Stichprobe zeigen im größeren Material eine der G a u ß 'schen Kurve ähnliche Häufigkeitsverteilung und können ebenfalls durch ihre Standard-Abweichung charakterisiert werden. Je größer die Stichproben sind, umso geringere Streuung hat die Stichproben-Verteilung.

Im allgemeinen kennt man Mittelwert und Standard-Abweichung der Population nicht. Wir müssen demzufolge an Hand einer Stichprobe Aufschlüsse mit statistischer Wahrscheinlichkeit gewinnen. In unseren Untersuchungen handelte es sich darum, die Normalverteilung von verschiedenen Laboratoriumswerten auf die "Population" gesunder Männer zu eruieren.

Wie eingangs geschildert, umfaßte unsere Stichprobe 50 Probanden und aufgrund der Meßergebnisse konnten folgende Mittelwerte und Standard-Abweichungen nach der bekannten Formel errechnet werden.

	Mittelwert	Standard-Abweichung
Rest-Stickstoff	31,46 mg %	8,25
Harnstoff nach Kowarsky	16,25 mg %	6,16
Harnstoff berechnet nach Formel	42,90 mg %	20,35
Harnstoff abgelesener Wert nach Eichkurve	42,76 mg %	20,39
Harnstoff-Stickstoff berechnet n. Formel	20,07 mg %	9,55
Harnstoff-Stickstoff abgelesener Wert nach Eich-Kurve	20,07 mg %	9,42

Wir wollen nun für die verschiedenen Untersuchungsergebnisse den Verläßlichkeits-Intervall bestimmen, in welchem der Populations-Mittelwert liegt. Und wir entschließen uns, ein Verläßlichkeits-Intervall zu fordern, das einem Verläßlichkeits-Niveau von 95 % entspricht.
Die Standard-Abweichung des Populations-Mittelwertes ist gegeben durch die Standard-Abweichung des Stichproben-Mittelwertes, dividiert durch die Wurzel der Versuchspersonen.

$$\sigma_M = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Es wurden für die verschiedenen Beobachtungsreihen folgende Standard-Abweichungen des Populations-Mittelwertes errechnet:

	Rest-N	Kowarsky	Harnstoff n.Formel	Harnstoff n.Eichkurve	Harnstoff-N n. Formel	Harnstoff-N n.Eichkurve
σ_M	1,17	0,87	2,87	2,88	1,35	1,33

Die Verläßlichkeitsintervalle auf dem 95 %igen Niveau der Verläßlichkeit betragen unter Verwendung der Tabelle der Normalverteilung von A. LINDNER (22) für:

Rest-Stickstoff	29,1 - 33,8 mg %
Harnstoff nach Kowarsky	14,5 - 18,0 mg %
Harnstoff berechnet nach Formel	37,1 - 48,6 mg %
Harnstoff abgelesener Wert nach Eichkurve	37,0 - 48,5 mg %
Harnstoff-Stickstoff berechnet n. Formel	17,4 - 22,8 mg %
Harnstoff-Stickstoff abgelesener Wert nach Eich-Kurve	17,4 - 22,7 mg %

Beispielsweise kann man also sagen, daß 95 % aller Mittelwerte für Rest-Stickstoff in einem Bereich von 29,1 - 33,8 mg% liegen.

Bei den Untersuchungen war es für uns weiterhin von Bedeutung, ob die Populations-Mittelwerte von Harnstoff bei der Bestimmung mit verschiedenen Methoden statistisch signifikant sind.
Es handelt sich hierbei um die Prüfung von Unterschieden zwischen unkorrelierten Mittelwerten und man bedient sich dabei des Verläßlichkeitsintervalls. Letzteres errechnet sich aus der Standard-Abweichung der Stichprobenverteilung dieses Unterschiedes.

Wir wollen also untersuchen, ob die Stichproben bei der Harnstoff-Bestimmung nach FEARON (5) und KOWARSKY (4) nur zufällig in ihren Mittelwerten und in ihrer Standard-Abweichung differieren. Dies geschieht nach:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_1 - M_1)^2 + \sum (x_2 - M_2)^2}{n_1 + n_2}}$$

Daraus läßt sich z der normierten Standard-Werte ermitteln, denn die Formel für den z-Wert heißt:

$$z = \frac{m_1 - m_2}{\sigma \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Rechnerisch ergibt sich als z-Wert 6,27.
Der z-Wert auf dem 99,9 %igen Verläßlichkeits-Niveau liegt bei der Normalverteilung bei $\pm$ 3.
Die Signifikanz der Unterschiede beider Methoden ist mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit gegeben.

Prüfen wir noch, ob eine statistisch signifikante Differenz zwischen der Harnstoff-Methode, einmal berechnet, das andere Mal nach einer Eichkurve abgelesen, müssen wir den gleichen wie oben beschriebenen Rechengang einschlagen.
Der errechnete z-Wert beträgt 0,02; eine statistische Signifikanz auf dem 99,9 %igen Verläßlichkeits-Niveau ist demnach nicht gegeben.

IV. Schlußfolgerung

In dem experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit und nach der statistischen Erfassung und Auswertung des Materials haben sich folgende wesentliche Punkte herauskristallisiert:

1) Die Mittelwerte des Total-Stickstoffes im Serum bewegen sich mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit bei einer "Population" gesunder Männer zwischen 29,1 - 33,8 mg%.
   Wir haben mit der Methode nach KJELDAHL (3) mit einer Streuung von 8,25 eine Abweichung, die um diesen Wert ruhen. Diese Daten stimmen im wesentlichen gut mit den Angaben von SUNDERMANN und BOERNER (23) überein, obwohl man berücksichtigen muß, daß es sich bei den genannten Autoren um statistisch nicht untersuchte Ergebnisse handelt.

2) Bei der Harnstoff-Bestimmung nach KOWARSKY (4) errechnete sich ein Populations-Mittelwert, der mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit zwischen 14,5 - 18,0 mg% liegt. Der Mittelwert der Stichprobe beträgt 16,25 mg% mit einer Standard-Abweichung von 6,16.

3) Die mit der kolorimetrischen Mikro-Metnode ermittelten Populations-Mittelwerte für Harnstoff liegen bei 37,1 - 38,6 mg%. Der Mittelwert der Population beträgt 42,9 mg% mit einer Standard-Abweichung von 20,35. Es ist dabei unerheblich, ob die Extinktion nach einer Eichkurve oder nach einer gegebenen Formel für die Gesamtbestimmung verwendet wird. Auffallend ist jedoch bei der Mikromethode die größere Abweichung der Werte.

4) Beim Vergleich der beiden Harnstoff-Methoden fallen zunächst die höheren Werte der Mikromethode gegenüber der Bestimmung nach KOWARSKY (4) auf. Statistisch haben sich signifikante Unterschiede ergeben. Bekannt sind die Fehler bei der Harnstoff-Bestimmung nach KOWARSKY (4), die im wesentlichen in der nicht vollständigen Umsetzung und Bildung von Stickstoff-Gasen beruhen und daher zu niedrige Werte vortäuschen. Genauer ist mit sehr großer Wahrscheinlichkeit dagegen die kolorimetrische Bestimmung mit Diacetylmonoxim, die man unter den genannten Bedingungen als nahezu spezifisch ansprechen kann. Berechnet man nämlich den Harnstoff-Stickstoff, so ergeben sich Werte, die um 17,4 - 22,8 mg% der Population schwanken und damit im wesentlichen den in der Literatur angegebenen Verhältnissen entsprechen, daß der Harnstoff etwa 50 Prozent des Total-Reststickstoffs ausmachen soll. Die Mikromethode ist also der nach KOWARSKY (4) deutlich überlegen, wenn auch eine größere Abweichung festgestellt wurde.

5) Weiterhin ist zu beachten, daß die Schwankungsbreite bei Bestimmungsmethoden in einem normalen chemisch-klinischen Labor statistisch größer ist als die der Literaturangaben. Was insofern verständlich ist, als die bekannten Mittelwerte der Literatur von routinierten und erfahrenen Personen durchgeführt werden. Praktisch läßt sich aber daraus die Forderung ableiten, daß für jede in einem Labor durchgeführte Bestimmungsmethode die Schwankungsbreiten und Fehlergrenzen der betreffenden Arbeitsmethoden festgelegt werden sollten.

Andrerseits ist der Arzt verpflichtet, die von einem Labor ihm mitgeteilten Werte nicht kritiklos anzuerkennen, sondern diese immer in der Gesamtschau mit dem klinischen Krankheitsbild zu beurteilen.
Ebenso erscheint uns die Forderung berechtigt, daß bei Neueinstellung in einem Labor jeweils von der betreffenden Person eine Reihe von Analysen zur Feststellung der persönlichen Fehlergrenze zu machen sind.

V. Zusammenfassung

An Hand verschiedener Bestimmungs-Methoden für Rest-Stickstoff und Harnstoff wurde einmal die deutliche Überlegenheit einer kolorimetrischen Methode gegenüber der volumetrischen nach KOWARSKY (4) festgestellt.
Auf der anderen Seite ergab sich bei der statistischen Auswertung der erhaltenen Ergebnisse relativ große Schwankungsbreiten bei allen angestellten Prüfungsmethoden gegenüber Angaben in der Literatur, wofür in erster Linie das weniger analytisch geschulte Personal wohl verantwortlich gemacht werden kann.
Es wurde durch die verschiedenen Forderungen für Arzt und Labor eine kritische Beurteilung und Bewertung der Laborwerte festgestellt.

VI. Literaturverzeichnis

(1) Belk und Sundermann - zitiert in dem Sonderdruck aus Röntgen- und Laboratoriumspraxis XIV. J. Heft 4 und 5 (1961)
Dr. R. H. H. Richter "Über Probleme und neue Untersuchungsmethoden im medizinisch-chemischen Laboratorium"
W. P. Belk und F. W. Sundermann Amer. J. Clin. Pathol. 17, 853 (1947)

(2) Wootton und King - zitiert in dem Sonderdruck aus Röntgen- und Laboratoriumspraxis XIV. J. Heft 4 und 5 (1961)
Dr. R. H. H. Richter "Über Probleme und neue Untersuchungsmethoden im medizinisch-chemischen Laboratorium"
I. P. P. Wootton und E.J. King - Lancet 1953, I, 470

(3) C. Kjeldahl-Fresenius-Zeitschr. f. analytische Chemie 22, 366 (1893), Rest-N-Bestimmung - Ausführung nach N. Henning "Klinische Laboratoriumsdiagnostik" (1959) Urban u. Schwarzenberg, Verlag München-Berlin

(4) Kowarsky - Harnstoff-Bestimmung
E. Spaeth und H. Kaiser (1936) "Chemische und mikroskopische Untersuchungen des Harns" S. 85

(5) W. R. Fearon und H. S. Friedmann - modifizierte Methode zur kolorimetrischen Harnstoff-Bestimmung mit Diacetylmonoxim siehe Nr. 16 und Nr. 20

(6) Dr. L. Hallmann (1948) "Klinische Chemie und Mikroskopie" Enteiweißung von Serum oder Vollblut S. 363

(7) Hoppe-Seyler-Thierfelder "Handbuch der Physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse" V/1, 22 - Springer-Verlag

(8) Sopp - zitiert in Dr. L. Hallmann (1948) "Klinische Chemie und Mikroskopie"

(9) A. Neumann - zitiert in Hoppe-Seyler-Thierfelder "Handbuch der Physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse" V/1,2. Veraschung mit Schwefelsäure H. 37, 115 (1902/03) und H. 43, 32 (1904/05)

(10) A. Friedrich - Hoppe-Seylers-Zeitschr. f. Physiologische Chemie 216, 68 (1933) "Über die generelle Anwendung der Mikro-Kjeldahlbestimmung"

(11) A. C. Andersen und B. N. Jensen-Fresenius-Zeitschr. f. analytische Chemie 67, 427 (1925/26) "Zur Bestimmung des N nach Kjeldahl" und 83, 114 (1931) "Zur Bestimmung des N durch Mikrokjeldahl"

(12) V. Klingmüller - Fresenius-Zeitschr. f. analytische Chemie 131, 17 (1950) "Zur Technik der Mikrostickstoffbestimmung nach Kjeldahl-Parnas"

(13) F. Knoop und G. Hüfner - Hoppe-Seylers-Zeitschr. f. Physiologische Chemie 101, 210 (1918) und 1, 350 (1877/78) "Über die Harnstoffbestimmung mit Hilfe von unterbromigsaurem Natron"

(14) E. Spaeth und H. Kaiser (1936) "Chemische und mikroskopische Untersuchungen des Harns" S. 85 Verfahren, die auf der Bestimmung des Stickstoffs beruhen.

(15) N. Henning - "Klinische Laboratoriumsdiagnostik" (1959) Harnstoff-Bestimmung nach Kowarsky - Umrechnungstabelle

(16) W. R. Fearon - Biochem. J. 33/1, 902 (1939) "The carbamido Diacetyl Reaction - A test for citrulline"

(17) R. Wheatly - Biochem. J. 43, 420 (1948) "An Improved Diacetyl Reaction for the estimation of Urea in Blood"

(18) S. B. Barker - J. Biol. Chem. 152, 453 (1944) "The direct colorimetric Determination of Urea in Blood and Urine"

(19) H. L. Rosenthal - Anal. Chem. 27/II, 1980 (1955) "Determination of Urea in Blood and Urine with Diacetyl Monoxime"

(20) H. S. Friedmann - Anal. Chem. 25/4, 662 (1953) "Modification of the Determination of Urea by the Diacetyl-Monoxime-Method"

(21) St. Hendrysson, O. W. Haseloff, H. J. Hoffmann - "Kleines Lehrbuch der Statistik" (1960) Walter de Gruyter-Verlag Berlin, Gauß'sche Kurve S. 46 Fig. 10

(22) A. Lindner - "Statistische Methoden" (1960) Birkhäuser-Verlag Basel und Stuttgart

(23) Sundermann und Boerner - "Normal Values in Clinical Medicine Philadelphia (1950) S. 110

Für die Überlassung des Themas, für die Abfassung des Referates und für die freundliche Unterstützung erlaube ich mir, Herrn Professor Dr. med. C.M. Hasselmann meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

L e b e n s l a u f

Am 17. 1. 1927 wurde ich, Carlfried Hasso S c h m i d ,
in Regensburg als Sohn des praktischen Arztes Dr. med. Carl Schmid und dessen Ehefrau Rosemarie Schmid, geb. Kobilyak geboren.
In Regensburg besuchte ich von 1934 bis 1938 die Volksschule. Von 1938 bis Herbst 1944 absolvierte ich die Oberschule an der Goethestraße zu Regensburg. Das Abitur bestand ich auf dem Sonderlehrgang für Kriegsteilnehmer an der Oberrealschule in Ingolstadt a.d. Donau am 31. 3. 1952.
Während meiner Oberschulzeit war ich vom 1. 1. 1944 bis Herbst 1944 als Luftwaffenhelfer eingesetzt. Im Herbst 1944 kam ich zum RAD. Ende Dezember 1944 wurde ich zur ehemaligen deutschen Wehrmacht einberufen. Nach kurzer Ausbildung Abstellung an die Ostfront und sowjetrussische Gefangenschaft im Mai 1945. Entlassung aus der Kriegsgefangenschaft am 2. 3. 1948. Von SS 1952 bis WS 1958/59 studierte ich Medizin in Regensburg (Außenstelle der Universität München) und Erlangen, sowie je ein Semester an der Universität Würzburg und München.
An der Universität Erlangen bestand ich am 31. 10. 1955 das Physikum und am 29. 9. 1961 das medizinische Staatsexamen.
Als Medizinalassistent arbeitete ich vom 1. 12. 1961 bis 31. 7. 1962 an der Universitäts-Hautklinik Erlangen.
Seit dem 1. 9. 1962 bin ich an der II. Medizinischen Klinik der Städtischen Krankenanstalten Nürnberg tätig.

Carlfried Schmid.

Photodruck von Foto Toni Erlangen